

平成21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590092  
 研究課題名（和文） 細胞間情報伝達因子CCNファミリー蛋白質の構造活性相関と創薬への応用  
 研究課題名（英文） Structure-activity relationship of intercellular signaling factor CCN family proteins and their application to drug development  
 研究代表者  
 森 宏樹（MORI HIROKI）  
 就実大学 薬学部 助教  
 研究者番号：40388989

研究成果の概要：多機能因子であるヒト CCN ファミリー蛋白質のうち代表的な3種の蛋白質（CCN1～CCN3）の高次構造の解明のため、CCN蛋白質発現リコンビナントバキュロウィルスが構築され、CCN蛋白質の大量発現・結晶化へと進んだ。また、関節リウマチにおけるCCN蛋白質の機能解析を試み、CCN蛋白質が関節リウマチ滑膜細胞で発現亢進しており、滑膜細胞活性化・異常増殖機構に関与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学，分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：CCN，構造解析，関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

CCNファミリー蛋白質は細胞間情報伝達分子の一種であり、そのファミリーにはCCN1～CCN6の6種類の蛋白質が属する。CCNファミリー蛋白質は線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞などに作用し、細胞分裂、細胞接着、細胞死、細胞外基質産生、細胞遊走を促進し、血管新生、腫瘍増殖、胎盤形成、着床、胚形成、軟骨内骨化を制御する。CCN1及びCCN2は内皮細胞に作用し、増殖・遊走・接着を誘導し、ま

た他の血管新生関連蛋白質の産生と活性を制御しながら血管新生を促進する。CCN3も弱い血管新生作用を有する。CCN3はCCN1,2と異なり細胞増殖において負の制御因子であり、細胞解離を促進し、細胞遊走を促進する。また、CCN3は神経、造血、血管、体節などの様々な分化過程に関係する遺伝子調節経路であるNotch経路上の細胞表面分子Notch1と相互作用し、筋芽細胞の分化を制御している。CCN2は軟骨細胞の増殖・分化・肥大化を誘導し、軟骨内分化を促進する。さらにCCN2はTGF- $\beta$ と共に肝臓、肺、血管、

皮膚、腎臓に作用し、細胞外基質産生を増加させることにより、肝硬変、肺線維症、動脈硬化、強皮症などを誘導することが分かっている。このように CCN ファミリー蛋白質それぞれは重複した生理活性を持つとともに、独自の生理活性を持つ。また、CCN ファミリー蛋白質同士で相反する生理活性を持つものもある。

以上のように CCN ファミリー蛋白質の多機能性が故に CCN ファミリー遺伝子の破壊は個体発生に重大な影響を与える。例えば CCN1 遺伝子ノックアウトは、胎盤発生時に血管新生が起こらず、致死となる。また、CCN2 遺伝子ノックアウトは軟骨細胞増殖異常、肥大化軟骨細胞での細胞外マトリックスの形成不全のため、主要骨格を欠き、致死となる。

こうした CCN ファミリー蛋白質の多機能性は、種々の分子と結合する4つの特徴的なモジュールから構成されるモザイク構造に由来すると考えられる。すなわち CCN ファミリー蛋白質は、N 末端側よりインスリン様成長因子結合蛋白モジュール (IGFBP)、フォンビルブランド因子タイプ C モジュール (VWC)、トロンボスポンジンタイプ I モジュール (TSP1)、C 末端システインノットモジュール (CT) の4つのモジュールから構成される。これら特徴的な4つのモジュール各々が独立に、あるいは相互作用しながら種々の分子と結合し、多様な生理活性を発現していると考えられる。実際、CCN2 は TSP1 モジュールを介して LDL 受容体に結合し、CT モジュールを介してヘパリンやインテグリン  $\alpha$ M $\beta$ 2 に結合する。また CCN3 の CT モジュールは細胞外マトリックス蛋白質 fibulin 1C や細胞表面受容体 Notch1 に結合する。特定の受容体蛋白質にだけ結合し、生理作用を発揮する多くの成長因子とは異なり、種々の細胞表面分子や細胞外マトリックス蛋白と相互作用し、情報伝達を制御していると考えられる。

CCN ファミリー蛋白質には選択的スプライシングあるいは翻訳後修飾により生じる幾つかのバリエーションが存在することが知られている。例えば CCN1, 2, 3 にはそれぞれ 1, 3, 2 種類のバリエーションが存在し、それらのバリエーションは CCN ファミリー蛋白質を特徴づけるモジュールを一つもしくは複数欠いたものである。CCN2-V3 は、ヒト骨芽細胞で選択的スプライシングにより生じ、CT モジュールを欠く CCN2 バリエーションであり、骨の細胞外基質蛋白質オステオカルシンの産生を制御している。CCN3-V1 は HeLa 細胞や 143 骨肉腫細胞の核内で検出され、RNA ポリメラーゼ II rpb7 サブユニットと相互作用し、腫瘍形成の促進作用を持つ。すなわち、CCN3 の全長型 (CCN3) の細胞増殖抑制作用と

CCN バリエーション (CCN3-V1) の増殖促進作用のバランスが正常細胞の増殖に重要である。

## 2. 研究の目的

神経栄養因子である BDNF, NGF 及び NT-3 間の全体構造は相似しているが、受容体蛋白質への結合に重要な部位の微小環境の違いが受容体結合の選択性に関わっている。こうした微小環境の差異が CCN ファミリー蛋白質間にも存在し、結合標的蛋白質への選択性を表現し、CCN ファミリー蛋白質それぞれの機能発現に必須であると考えられる。そこで、CCN ファミリー蛋白質を中心とした情報伝達機構と分子認識機構の理解を目指し、CCN ファミリー蛋白質の構造と機能発現の相関を「CCN1,2,3 蛋白質及びそのバリエーション蛋白質の立体構造解明」に焦点を当て解析することを目的とした。

また、DNA マイクロアレイを用いた関節リウマチ増殖滑膜細胞の遺伝子発現プロファイリングにより CCN ファミリー蛋白質やあるクラスター分化抗原の発現亢進が見出されたので、関節リウマチ増殖滑膜細胞における CCN ファミリー蛋白質やクラスター分化抗原の機能についても解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CCN ファミリー蛋白質の大量発現

①大腸菌での CCN ファミリー蛋白質の発現  
ヒト CCN1~3 遺伝子は成熟体に対応する DNA 配列を PCR にて増幅後、pET32bプラスミド (ヒスチジンタグ融合蛋白質) や pGEX2T プラスミド (GST 融合蛋白質) にクローニングした。得られたヒト CCN 蛋白質発現ベクターは BL21 ( $\lambda$ DE3) 株に形質転換した。この大腸菌にはシャペロン蛋白質発現プラスミドも導入した。ヒト CCN 融合蛋白質を発現させた大腸菌は、超音波処理により破壊し、可溶性成分を Ni カラムやグルタチオンカラムに供し、発現 CCN 蛋白質を精製した。

### ② *Brevibacillus chosinesis* での CCN ファミリー蛋白質の発現

ヒト CCN1~3 遺伝子は成熟体に対応する DNA 配列を PCR にて増幅後、プロモーター活性の異なる2種類のプラスミド (pNCM02, pNY326) にクローニングした。得られたプラスミドは *Brevibacillus chosinesis* に形質転換し、CCN 蛋白質の発現の検定を行った。

### ③ 昆虫 Sf9 細胞での発現

ヒト CCN1~3 遺伝子を PCR により増幅

後、バキュロウイルストランスファーベクター-pBac-2cpにクローニングした。ヒト CCN 遺伝子を持つ pBac-2cp は BacMagic DNA (AcNPV)と共に昆虫細胞 Sf9 にトランスフェクションし、リコンビナントバキュロウイルスを産生させた。

#### (2) 関節リウマチにおける遺伝子発現解析

関節リウマチおよび変形性関節症滑膜細胞から Total RNA を抽出し、CCN 遺伝子やその他遺伝子の発現は、各遺伝子に対する TaqMan プローブを使った定量 PCR により定量した。

滑膜肉腫細胞株 SW982 をモノクローナル抗体により刺激し、24 時間後刺激細胞あるいは無刺激細胞から Total RNA を抽出した。Total RNA より Cy5, Cy3 標識 aRNA を合成し、それらを DNA チップ (Agilent 社) にハイブリダイズさせ、各遺伝子スポットの蛍光量を DNA チップスキャナーで測定し、各種の補正後、数値化し、両細胞間の遺伝子発現の変化を解析した。また遺伝子発現プロファイルは Ingenuity Pathway Analysis により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) CCN ファミリー蛋白質の高次構造解析

CCN ファミリー蛋白質の結晶化に必要な CCN ファミリー蛋白質の大量発現系の確立を目指した。大腸菌では GroEL/GroES, DnaK/DnaJ, GrpE, Trigger Factor など種々のシャペロン蛋白質と CCN 融合蛋白質との共発現系を確立し、ヒト CCN2 ヒスタグ融合蛋白質を可溶性発現することに成功した。しかし、その精製途中で融合蛋白質が不溶化してしまい、大量精製には至らなかった。低温での発現誘導や低濃度発現誘導剤を用いた発現誘導などを試みたが、可溶性発現するものの精製途中で不溶化してしまった。GST-ヒト CCN1 融合蛋白質もシャペロン蛋白質との共発現系により可溶性発現に成功したと思われたが、ヒト CCN2 ヒスタグ融合蛋白質同様に精製途中で不溶化してしまい精製に至らなかった。

大腸菌では可溶性発現が困難な蛋白質の大量発現の例が報告されているブレヴィバシラスを用いて CCN 蛋白質の大量発現系の確立を試みた。しかし、ブレヴィバシラスでは発現プラスミドの構築さえ成功しなかったり、発現プラスミドが構築できた時にも CCN 蛋白質の発現が全く確認できなかった。

発現方法が簡易かつ蛋白質大量発現のコストが低い原核生物を用いた蛋白質発現系では可溶性 CCN 蛋白質が精製されなかったため、哺乳類生物の蛋白質発現の成功率が高

い昆虫細胞を用いた蛋白質発現系の確立を目指した。CCN 蛋白質発現リコンビナントバキュロウイルスが確立され、CCN 蛋白質の発現も確認された。

CCN ファミリー蛋白質の結晶化・高次構造は未だ報告されていない。原核細胞を用いた蛋白質発現系では精製蛋白質が得られなかったが、昆虫細胞発現系では高等真核生物特有の翻訳後修飾能力も有しており、より高い生物活性と構造を保持した組換え蛋白質を大量に生産できると予想される。今後、昆虫細胞発現系を用いた CCN 蛋白質の大量発現・結晶化そして高次構造を解明することにより、CCN ファミリー蛋白質間の構造的な差違とファミリー蛋白質の機能差違の関連性を明らかにしていきたい。さらには、CCN ファミリー蛋白質やその他蛋白質に共通して保存されているドメイン間の共通機能を議論したい。

### (2) 関節リウマチ滑膜細胞における CCN ファミリー蛋白質

DNA マイクロアレイを用いた関節リウマチ (RA) 増殖滑膜細胞と変形性関節症 (OA) 滑膜細胞の遺伝子発現プロファイルと比較すると、CCN ファミリーである CCN5 が RA 増殖滑膜細胞でより多く発現していることが見出された。RA 増殖滑膜細胞中におけるその他 CCN ファミリー遺伝子の発現を定量 PCR で調べてみると、CCN1, 2, 3, 4 の発現は OA 滑膜細胞と比較してそれぞれ 4.5, 7.3, 1.3, 25.6 倍多いことが確認できた。また、免疫組織染色により RA 滑膜組織ではこれら CCN 蛋白質が OA 滑膜組織に比較してより多く確認できた。これらのことから、RA 増殖滑膜細胞では CCN ファミリー蛋白質の発現が OA 滑膜細胞より亢進していることが判明した。

CCN4 および 6 遺伝子には複数の転写バリエーションの存在が知られており、それら転写バリエーションの発現を RT-PCR にて調べてみると、トロンボスポンジタイプ I モジュールと C 末端システインノットモジュールを欠く転写バリエーション CCN6-V1 が RA 増殖滑膜細胞において発現していることが確認され、RA 発症や進行に関連する可能性が示唆された。

Notch シグナルが RA 増殖滑膜細胞の活性化に関与することが明らかになっている。また、CCN 蛋白質が Notch と相互作用することも示唆されている。これらのことより CCN 蛋白質が Notch シグナルへのメディエーターとして機能し RA 増殖滑膜細胞の活性化を誘導している可能性が示唆される。今後より詳細に RA 増殖滑膜細胞における CCN 蛋白質の機能を解析することにより活性化機構の一端が明らかにされると考えられる。

上記の遺伝子発現プロファイル比較により RA 増殖滑膜細胞においてクラスター分化抗原の一種の発現亢進が確認された。ヒト滑膜肉腫細胞株 SW982 を用いて、このクラスター分化抗原に対する抗体刺激による遺伝子発現応答を DNA チップを用いて調べてみると、RA 関連遺伝子や骨代謝関連遺伝子に発現の変化が見られた。このことからこのクラスター分化抗原が RA の発症あるいは滑膜細胞の異常な増殖に関わっていることが示唆された。発現変化が確認された遺伝子群の中には多くの Notch シグナル関連分子や G タンパクシグナル関連分子があり、これら分子とクラスター分化抗原とのシグナル伝達経路上での相互作用が示唆された。

関節リウマチ発症時における滑膜細胞の活性化の分子メカニズムについては未解明な部分が多い。RA 増殖滑膜細胞中で発現亢進している遺伝子群に CCN ファミリー蛋白質やクラスター分化抗原の一種が確認され、これら分子と RA 関連遺伝子群の間に相互作用が示唆された。CCN 蛋白質やクラスター分化抗原との直接的な相互作用は見出されていないが、今後これら遺伝子の上流・下流に存在する遺伝子群を同定し、相互作用を明らかにすることにより、滑膜細胞の活性化や異常増殖の全体像が明らかになり、関節リウマチに対する新たな創薬ターゲットも発見されると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hiroki Mori, Yoshitaro Itano, Naoya Kobayashi, Yoshikazu Kosaka, Noriaki Tanaka, Hitoshi Nagatsuka, Masahisa Inoues, Kojun Setsu, Tohru Nakanishi. 2007. Characterization and Gene Expression Profiling of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Hard Tissue Biol.* 16, 36-41, 査読有
- ② Yoshikazu Matsuoka, Masataka Yokoyama, Hiroyuki Kobayashi, Megumi Omori, Yoshitaro Itano, Kiyoshi Morita, Hiroki Mori, Tohru Nakanishi. 2007. Expression profiles of BDNF splice variants in cultured DRG neurons stimulated with NGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 682-8, 査読有
- ③ Hiroki Mori, Tohru Nakanishi. 2008. Signal Transduction of Inflammatory Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis.

*Yakugaku zasshi* 128, 263-268, 査読有

- ④ Hiroki Mori, Kei-ichiro Nishida, Toshifumi Ozaki, Hiroshi Inoue, Tohru Nakanishi. 2008. Isolation of a mRNA Preferentially Expressed in Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis that is Identical with Lumican, which Encodes a Collagen Binding Extracellular Matrix Protein. *J. Hard Tissue Biol.* 17, 125-130, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① ヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現解析と分化制御機構の解明. 永留舞, 森宏樹, 岡田充泰, 松下有美, 小阪芳和, 小林直哉, 田中紀章, 中西徹. 第 4 6 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2007 年 11 月 11 日, 高知市文化プラザ「かるぽーと」, 四国医療工学専門学校 (高知市)
- ② 炎症性疼痛において BDNF 遺伝子は後根神経節からプロモーター選択的に発現誘導される. 松岡義和, 横山正尚, 小林宏行, 大森恵, 板野義太郎, 森田潔, 森宏樹, 中西徹. 日本薬学会第 1 2 8 年会, 2008 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜など (横浜市)
- ③ DNA マイクロアレイによる関節リウマチ滑膜関連遺伝子の単離と WISP 遺伝子を中心とするその解析. 森宏樹, 西田圭一郎, 中西徹. 第 1 7 回硬組織再生生物学会, 2008 年 8 月 30 日, 徳島文理大学 (徳島市)
- ④ アセチルコリン受容体ノックアウトマウスの遺伝子発現解析. 岡田充泰, 森宏樹, Maskos Uw, Changeux Jean-Pierre, 筒井公子, 中西徹. 第 4 7 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2008 年 11 月 8 日, 岡山コンベンションセンター「ママカリフォーラム」 (岡山市)
- ⑤ DNA チップを用いた関節リウマチ原因遺伝子の解明. 松下有美, 森宏樹, 西田圭一郎, 尾崎敏文, 長塚仁, 中西徹, 第 4 7 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2008 年 11 月 8 日, 岡山コンベンションセンター「ママカリフォーラム」 (岡山市)
- ⑥ Establishment of overexpression system of multifunctional CCN family proteins for structural analysis. Junko Kato, Hiroki Mori, and Tohru Nakanishi. The ASCB 48th Annual Meeting, Dec 14, 2008,

Moscone Center, San Francisco, CA, USA

- ⑦ 関節炎におけるテトラスパニンの機能解析. 森宏樹, 松下有美, 岡田充泰, 中島利博, 中川周士, 新井裕志, 久保俊一, 中西徹. 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 国立京都国際会館など(京都市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 宏樹 (MORI HIROKI)  
就実大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40388989

### (2) 研究分担者

中西 徹 (NAKANISHI TOHRU)  
就実大学・薬学部・教授  
研究者番号: 30243463

森 秀治 (MORI SHUJI)  
就実大学・薬学部・教授  
研究者番号: 50220009